—— [シンポジウム] アイソザイム研究の現状と展望 ——

4. アイソザイムの集団遺伝学*

—— ヒトにおける酵素の多型形質 ——

佐 藤 千代子**

二つ以上の対立遺伝子が集団中に存在し、頻度の低い対立遺伝子も反復突然変異だけでは説明できないような頻度の場合に、多型現象 (polymorphism) と定義している¹⁾。このような頻度とは、少なくとも0.01以上とされているので、最も頻度の高い対立遺伝子の頻度も0.99以下である。しかし、この数字は便宜的に定められたものである。

ヒトの多型現象で最初に発見されたものは、Landsteinerによって1900年に発見されたABO血液型の多型現象であった。O. Smithiesが、1955年にでんぶんゲル電気泳動法 (SGE)²⁾と、それを用いて観察したヒトのハプトグロビンの多型現象を発表して³⁾以来、SGEはヒトの集団遺伝学に急速に導入された。集団調査において、最も入手し易い検体である血液中の蛋白質、酵素の分析が広く行われ、allelic isozymes (allozymes) に関する多くのデータが集積された。その後SGEよりも短時間で検査が可能で、分離能の優れたポリアクリルアミド薄層ゲル電気泳動法、ポリアクリルアミド薄層等電点分離法 (PAGIEF)、ポリアクリルアミド薄層ゲル2次元電気泳動法が次々に導入された。特に等電点分離法 (IEF) によって、SGEによる分析では単一とされていたバンドが、2本のサブバンドに分離され、それぞれが異なる対立遺伝子の産物であることが明らかとなった蛋白質も2、3にとどまらなかった。一方、酵素の活性、熱安定性の測定、および抗体を用いた酵素蛋白質の定量等により、電気泳動的には分離できないアイソザイムの検出も行われるようになり、ヒト集団の不均一性がより広汎なものとして理解されるようになった。集団遺伝学、遺伝生化学的に興味ある酵素は多いが、本報では、血液中に存在し

SGEによって多くの集団で検査されている多型形質、および、量的変異形質で、多型またはそれに近い頻度を示したものを紹介する。さらに、PAGIEFを用いてはじめて検出されたPGM1のアロザイムと、その進化の機構、および突然変異との関係について論じたい。

主要3人種のコーカソイド、ネグロイド、モンゴロイドの何れの集団においても、SGEで多型の観察される赤血球酵素には、酸性ホスファターゼ (ACP1)、ホスホグルコムターゼ-1と-3 (PGM1とPGM3)、エステラーゼD (ESD)、グルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ-1 (GPT1)、6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ (6PGD)、アデノシンデアミナーゼ (ADA) が知られている⁴⁾ (Table 1)。主要対立遺伝子頻度に、人種によって差のある場合もあり、頻度の低い多型性の対立遺伝子が観察されない集団もある。ACPI**A*とACPI**B*, PGM3**1*とPGM3**2*, ESD**1*とESD**2*は前者の例であり、ACPI**C*, ACPI**R*, PGM1**7*, ESD**5*, ESD**7*は後者の例である。

特定の人種だけに共通な対立遺伝子は、主要3人種がそれぞれ分離してからの、比較的新しい時代に生じた突然変異に由来するものと考えられ、ヒト集団のマーカーとして利用される。その点では、特定の集団においてのみ多型である酵素の対立遺伝子も同様に利用される。それらには、AKI**2* (コーカソイド)、GOTI**2* (モンゴロイド)、PEPA**2* (ネグロイド)、PEPD**3* (ネグロイド)、PGM2**2* (ネグロイド) 等がある。蛋白質をコードする遺伝子座の中で多型性遺伝子座の占める割合は、人種によって異なるが、30-40%とされている⁵⁾。しかし、これらの値は、量的に多く存在し、基質特異性の少ない酵素、蛋白質群から得られているの

* Isozymes in population genetics —— Enzyme polymorphism in man ——

** Chiyoko Satoh, 放射線影響研究所 (広島) 臨床検査部遺伝生化学。

Table 1. Polymorphic red cell enzymes.

Enzyme	Alleles	Caucasoids	Negroids	Mongoloids
ACP1	<i>ACPI* A</i>	0.373	0.14	0.197
	<i>ACPI* B</i>	0.571	0.84	0.803
	<i>ACPI* C</i>	0.057	—	—
	<i>ACPI* R</i>	—	0.02	—
PGM1	<i>PGM1* 1</i>	0.764	0.855	0.753
	<i>PGM1* 2</i>	0.235	0.145	0.231
	<i>PGM1* 7</i>	—	—	0.016
PGM3	<i>PGM3* 1</i>	0.740	0.340	0.809
	<i>PGM3* 2</i>	0.260	0.660	0.191
ESD	<i>ESD* 1</i>	0.881	0.913	0.628
	<i>ESD* 2</i>	0.100	0.085	0.364
	<i>ESD* 5</i>	0.019	0.002	—
	<i>ESD* 7</i>	—	—	0.008
GPT1	<i>GPT1* 1</i>	0.523	0.872	0.624
	<i>GPT1* 2</i>	0.474	0.128	0.376
6PGD	<i>PGD* A</i>	0.978	0.893	0.913
	<i>PGD* C</i>	0.021	0.104	0.087
ADA	<i>ADA* 1</i>	0.950	0.996	0.973
	<i>ADA* 2</i>	0.050	0.004	0.027

で、真に蛋白質をコードする遺伝子座を代表するものとは考えられない。

アロザイムは、電気泳動上の移動度だけでなく、その活性、安定性が互いに異なる場合が多い。ACP1のアロザイムA、B、Cの活性および安定性は $A < B < C$ の順に高い⁶⁾ (Fig.1)。6PGDのアロザイムA、Cの活性の差は大きく無いが⁷⁾、安定性は大きく異なっている⁸⁾。一方、日本人で多型を示すGOT1において、アロザイム2の活性は、アロザイム1の値の約50%にすぎない⁷⁾が、安定性に差は無い⁸⁾。このような特質を持つアロザイムを産生する対立遺伝子が、集団中に高い頻度で保持される機構を説明するものとして、自然選択説と中立説がある。しかし、それらを解説することは本報の目的とするところでは無い。

現在知られている多型形質の中で、選択要因の明らかなのは多くは無い。G6PDの多型現象は、マラリアという環境要因による選択の結果と考えられるものの一つである⁹⁾。黒人集団、地中海沿岸および中東の集団、東南アジアの集団には、抗マラリア剤のプリマキ

Fig.1. Distribution of red cell acid phosphatase (ACP1) activities in the general population (-----) and in the separate phenotypes. (Hopkinson and Harris, 1969)

ン、サルファ剤その他の薬剤の投与や、ソラ豆の1種 (vicia fava) の摂取で、重症の溶血性貧血を起こす人々が存在する。これらの人々のG6PDは、黒人では

A⁻, 地中海沿岸地域 (特に Sardinia) では B⁻ (Mediterranean), 中国では Canton, タイでは Mahidol と, 何れも活性の低い, 不安定な変異型である. これらアロザイムの分布は, マラリアの流行する地域と一致し, (Fig. 2) また, HBS, HBE, β -サラセミア等の異常ヘモグロビンの分布とも一致した¹⁰⁾. これら異常ヘモグロビン, 特に HBS においては, マラリアによる選択が詳しく研究されている. HBS を持つ赤血球は, マラリア原虫 (*falciparum malaria*) に対して抵抗性のあることが報告され¹¹⁾, G6PD に関しても同様な報告がある¹²⁾. これらの知見に基づいて, 低活性 G6PD 変異型をコードする対立遺伝子は, マラリアによる選択の結果, 多型の頻度に維持されてきたと理解されている.

赤血球酵素において, 酵素活性に対するスクリーニングが行われ, null 対立遺伝子が多型の頻度で検出された例としては, 黒人集団の *TPI*QO* があり, 対立遺伝子頻度 0.024 が報告されている¹³⁾. この対立遺伝子に対してヘテロ接合の黒人の赤血球トリオースリン酸イソメラーゼ (TPI) の平均活性値は, 正常値の 57% で

あった. 電気泳動パターンと熱安定性は正常型と変わらず, TPI 抗体と結合する蛋白質量は正常値の 1/2 であったため, *TPI*QO* 対立遺伝子を持つこれらのヘテロ接合の人々の TPI 遺伝子座においては, TPI 蛋白質の合成が行われていないものと考えられる. 日本人集団では, 炭酸脱水酵素-1 の null 対立遺伝子 *CAI*QO*, ピルビン酸キナーゼ (PK) の低活性変異型をコードする対立遺伝子が, 多型とされる頻度よりは低いが, 0.004¹⁴⁾ および 0.007¹⁵⁾ の頻度で検出されている. TPI, CAI, PK の何れにおいても, 電気泳動上の変異型の頻度は非常に低いことと対照的である.

PGM1 には, SGE で分離されるアロザイム 1 と 2 があり, 2 をコードする対立遺伝子 *PGM1*2* は, 調査された全集団において多型の頻度を示した. *PGM1*7* は, 東南アジア, 南太平洋には多型の頻度で存在する¹⁵⁾. 日本人, 中国人, マレーシア土着人では, 0.01~0.03 であるが, 西カロライナ諸島では, 0.06 に達している (Fig. 3). また, *PGM1*3* の, パプアニューギニア, 西カロライナ諸島における頻度は 0.1 におよぶ¹⁵⁾. 沖縄, 長崎, 広島でも PGM1 3 と非常によく似たアロザ

Fig. 2. World distribution of G6PD deficiency (A) and malignant malaria (B). (Man's Haemoglobins, Lehman and Huntsman, 1974)

Fig. 3. The known distributions of the *PGM1*3* and *PGM1*7* alleles in the Asia-Pacific area. (Takahashi et al. 1982)

イムが検出され、沖縄の酵素は3OKINAWA、長崎、広島酵素は3NG1と命名されているが、でんぷんゲル上での移動度は同一で、対立遺伝子頻度はそれぞれ0.0039, 0.0022, 0.0009と、より南に位置する集団ほど高い¹⁶⁾。この3NG1は、日本人のPGM1のまれな変異型の中では最も頻度が高い。有史以前の日本列島にはアイヌ人によく似た人々が広く居住していたが、琉球、南西諸島からの集団の移動と、朝鮮半島からの集団の移動によって、徐々に北方へと押しやられて行ったと考えられていること、アイヌにはPGMI*7、PGMI*3は無く、中国人集団にはPGMI*3は検出されていないこと、Fig. 2に見られる対立遺伝子の分布、さらに3NG1, 3OKINAWAの頻度を総合すると、南方からの集団の移動の影響は、日本の南西部においては中央部におけるよりもほぼ3倍強いものと考えられる¹⁷⁾。PGM1には、このほかまれな変異型も多数報告されておりSGEが唯一の検査法であった時代にも、変異の多い多型性酵素であった。

酸性緩衝液を使うSGE、またはPAGIEFによって、PGM1のアロザイム1が、1Sと1Fまたは、1+と1-、2が2Sと2Fまたは2+と2-のサブタイプに分離されるようになりPGM1の集団遺伝学におけるマーカーとしての重要性は更に増大した。3大人種の全てにおいて、このサブタイプの存在は確認され、それらが4種の対立遺伝子PGMI*1+, PGMI*1-, PGMI*2+, PGMI*2-の産物であることが明らかとなった。(Table 2) これら対立遺伝子の頻度には、人種による特徴があるが、ロンドンのアジア人集団を除いて全ての集団

でPGMI*1+の頻度が最も高く、PGMI*2-の頻度が最も低かった¹⁸⁾。また、何れの集団でも、PGMI*1+とPGMI*1-の頻度の和は、PGMI*1の頻度と等しく、PGMI*2+とPGMI*2-の頻度の和は、PGMI*2の頻度と等しかった。我々は、PAGIEFによって7を7+と7-、3を3+と3-のアロザイムに分離した(Fig. 4)。家族調査の結果から、これらは何れも異なる対立遺伝子の産物であることが明らかとなった¹⁷⁾。

Fig. 4. Position of 8 allozyme bands of PGM1 after isoelectric focusing. (Takahashi et al. 1982)

Table 2. Frequencies of the PGM1 alleles determined by IEF.

Population	n	1+	1-	2+	2-	7+	7-	Reference
N. European	2,773	0.627	0.132	0.182	0.058	—	—	Carter et al. (1979)
Negroes								
Keneba the Gambia	637	0.795	0.053	0.133	0.019	—	—	Welch et al. (1978)
London	384	0.672	0.126	0.173	0.027	—	—	Carter et al. (1979)
Asian								
Japan	788	0.6758	0.1142	0.1434	0.0603	0.0057	0.0006	Takahashi et al. (1982)
London	120	0.537	0.096	0.246	0.121	—	—	Carter et al. (1979)

他の日本人集団に検出された7も7+と7-に分離されている。僅かな等電点の差を持ったアロザイムが、少なくとも4組検出されたのだが、これらを作る対立遺伝子は如何にして生まれたのであろうか？

*PGMI**1+, *PGMI**1-, *PGMI**2+, *PGMI**2- の4種の対立遺伝子の生成に関してCarterらは、「*PGMI*の祖先遺伝子は*PGMI**1+であって、その遺伝子にそれぞれ独立に2個の突然変異が生じて*PGMI**2+と*PGMI**1-が生成し、この二つの遺伝子内交叉によって*PGMI**2-が生じた。」という仮説を提出した¹⁸⁾。この仮説は次の事実に基づいている。①SGEとIEFによって、類人猿(チンパンジー、ゴリラ、オランウータン)のPGM1を調べたところ、SGEではヒトの1と、IEFではヒトの1+アイソザイムと移動度の殆ど同じバンドが観察された(Fig. 5)。②ヒトの3大人種において、例外を除くと*PGMI**1+の頻度が最大、*PGMI**2-の頻度が最少。さらに③彼らの条件で、アロザイム1+と2+との等電点の差は、酸性側に0.18pH unitである。アロザイム1+にアミノ酸置換が生じ、酸性側に電荷1個分の変化を生じ2+ができたと考える。1+と1-の等電点の差は、塩基性側に0.05pH unitであり、1+に塩基性側に電荷が1個分移るようなアミノ酸置換が生じて1-ができたと考える。第3のアロザイム2-と1+との等電点の差は酸性側に0.10であるから、2+と1-の各々に生じたアミノ酸置換が、同一蛋白質分子内に存在すると考えることができるというものであった。2-をコードする対立遺伝子*PGMI**2-が、第3の突然変異で生じたと考えることも勿論できるが、2個の遺伝子の遺伝子内

Fig. 5. Primate PGM phenotypes on starch gel electrophoresis and isoelectric focusing. (Carter et al. 1979)

A. Starch gel electrophoresis

- 1, 4, 7: Human PGM1 1-2
2, 3: Pongo
5, 6: Gorilla

B. Isoelectric focusing

- 1, 2: Gorilla
3: Human PGM1 1⁺2⁻
4, 5: Pongo
6: Human PGM1 1⁻2⁺

交叉によって新しい対立遺伝子が生じたと考えられる事例は、ハプトグロビンの遺伝子等に関しては既に証明されており、遺伝子内交叉の起り得る可能性は十分に考えられる。

我々は、Carterらの仮説を7+, 7-, 3+, 3-をコードする対立遺伝子の生成にも導入することを試みた¹⁷⁾。Table 3に、我々の測定した8種のアロザイムの等電点を示す。①4組の(+)アロザイムと(-)アロザイムの等電点の差は、何れも塩基性側に0.1pH unitで、Carterが1-アロザイムに想定したアミノ酸置換が共通に存在すると考えれば説明できる。②1+と7+の等電点の差は酸性側に0.3pH unitで、電荷1個の変化として考えられるが、1+と3+の差0.5pH unit

Table 3. The pI values of the products of the eight alleles at *PGMI* locus.

Isoelectric type	pI value	Isoelectric type	pI value
1+	6.3	1-	6.4
2+	6.1	2-	6.2
7+	6.0	7-	6.1
3+	5.8	3-	5.9
Differences			
1+ - 2+ = 0.2	+ 0.5	1- - 2- = 0.2	+ 0.5
1+ - 7+ = 0.3		1- - 7- = 0.3	
1+ - 3+ = 0.5		1- - 3- = 0.5	

(酸性側)は少なくとも電荷2個分の変化である。しかし、塩基性アミノ酸から酸性アミノ酸への1回の置換による等電点の差は、ヘモグロビンで報告された例ではもっと小さい値であり、アミノ酸置換が2ヶ所で起ったものと考えの方が妥当である。③ Table3に見られるように、1+と3+の差0.5pH unitは、1+と2+の差0.2pH unitと、1+と7+の差0.3pH unitの和となっている。(一)アロザイム相互間にも同様な関係がある。2+を生ぜしめたアミノ酸置換と、7+を生ぜしめたアミノ酸置換が同一分子内に存在しているものが、3+アロザイムである。3-アロザイムには、さらに1-を生ぜしめたアミノ酸置換ものっていることになる。以上をまとめると、「祖先遺伝子 $PGMI^*1+$ に独立に3回の突然変異が起って、新しい3個の対立遺伝子 $PGMI^*1-$, $PGMI^*2+$, $PGMI^*7+$ が生じる。これら合計4個の対立遺伝子間の遺伝子内交叉が4回起れば、 $PGMI^*2-$, $PGMI^*7-$, $PGMI^*3+$, $PGMI^*3-$ が生じる。」という仮説で8個の対立遺伝子の誕生を説明できる (Fig. 6)。

これら8個の対立遺伝子のうち、1+, 1-, 2+, 2-をコードする対立遺伝子はどの人種にも高い頻度で検出されるので、アジア-太平洋地域にのみ、低い頻度で分布する7+, 7-, 3+, 3-をコードする対立遺伝子よりも古いものと考えられる。それにつづもの

Fig. 6. A proposed phylogeny relating eight alleles in the PGM1 system.

The symbol μ indicates origin through mutation. The position of the postulated crossover is in each instance indicated by an X. (Takahashi et al. 1982)

は、分布域の広さと頻度から7+である可能性が高い。しかし、頻度には選択と機会的変動の結果が入る可能性がある。一方、想定された突然変異によって生じた塩基置換の位置によって連鎖不平衡も変化すると考えられる。我々は、将来PGM1遺伝子のDNA配列が明らかになった時、この仮説を検討できることを期待している。

この仮説によると、DNAの組み替えによって新しい対立遺伝子が作られるので、見かけ上の突然変異が起ることになる。例えば、 $PGMI^*2+ / PGMI^*7+$ の遺伝子型を持つヘテロ接合の人の子供にアロザイム3+が検出されると、点突然変異の結果と考えられるであろう。この場合、遺伝子内交叉によって生じた新しい対立遺伝子 $PGMI^*3+$ は、いわゆるハプロタイプであるが、電気泳動法で検査する限りは、見かけ上、点突然変異となるのである。もし、真の突然変異によって生じた塩基置換が集団中にn個固定されると、それらの間の交叉によって生成するものも含め、対立遺伝子数の合計は 2^n となる。真の突然変異の頻度に比べ、遺伝子内交叉の頻度は高いと考えられるので見かけ上の突然変異率は高くなるだろう。

自然環境、地理的特徴、集団成立の歴史などの類似した日本人とイギリス人のPGM1を比較すると、日本人のPGM1では、対立遺伝子の数もそれらの頻度も高い。一方、姉妹遺伝子と考えられているPGM2において、日本人の変異は非常にまれである。日本とイギリスにおいて、特別な選択要因の存在は考えられないためPGM1の多様性の差は、突然変異率の差と考えざるを得なかった¹⁹⁾。前述の仮説に従えば、日本人には多型に近い頻度で存在する $PGMI^*7+$ が見かけ上の突然変異率の上昇に寄与している可能性がある。日本人のPGM2には、それに相当する対立遺伝子が存在しないため新しい対立遺伝子の生成の機会が無かったと考えられる。

PGM1遺伝子座内には、このようにSGEで分離される多型性を示すサイトと、IEFで分離される多型性を示すサイトがあるのだが、このほかにSGEで分離されるサイトと強い連鎖不平衡を示し、熱安定性を支配するサイトの存在が報告されている²⁰⁾。また、Nigeriaの集団においては、G6PDの活性を支配し、電気泳動では分離されない隠された多型性のサイトの存在する可能性が報告されている²¹⁾。このような構造遺伝子内の“multisite intragenic polymorphism”の有無は、

将来、遺伝子内 DNA の塩基配列の分析によって明らかにされるであろう。

文 献

- 1) Ford, E.B. : In The New Systematics, Ed. J.C. Huxley, Oxford Univ. Press, Oxford, 1940.
- 2) Smithies, O. : Biochem. J., **61** : 629, 1955.
- 3) Smithies, O. and Walker, N.F. : Nature, **176** : 1265, 1955.
- 4) Beckman, G. : Enzyme polymorphism, in The Biochemical Genetics of Man, 2nd ed., Eds. D.J.H. Brock and O. Mayo, Academic Press, London, New York, San Francisco. 1978, 185—269.
- 5) Nei, M. and Roychoudhury, A.K. : Am. J. Hum. Genet., **26** : 421, 1974.
- 6) Hopkinson, D.A. and Harris, H. : In Biochemical Methods in Red Cell Genetics, Ed. J.J. Yunis, Academic Press, New York, London, 1969, 337—375.
- 7) Satoh, C. et al. : Am. J. Hum. Genet., **35** : 656, 1983.
- 8) Satoh, C. et al. : Ann. Hum. Genet., in press.
- 9) Livingstone, F.B. : Ann. Rev. Genet., **5** : 33, 1971.
- 10) Lehmann, H. and Huntsman, R.G. : In Man's Haemoglobins. 2nd ed. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, Oxford, 1974.
- 11) Pasvol, G. et al. : Nature, **274** : 701, 1978.
- 12) Luzzatto, L. et al. : Science, **164** : 839, 1969.
- 13) Mohrenweiser, H.W. and Fielek, S. : Pediatr. Res., **16** : 960, 1982.
- 14) Goriki, K. and Hazama, R. : In Proceedings of Current Status of the Biology and Chemistry of Carbonic Anhydrase, 1983.
- 15) Blake, N.M. and Omoto, K. : Ann. Hum. Genet., **38**, 251, 1975.
- 16) Satoh, C. et al. : Jpn. J. Hum. Genet., in press.
- 17) Takahashi, N. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci., **79** : 6636, 1982.
- 18) Carter, N.D. et al. : Ann. Hum. Biol., **6** : 221, 1979.
- 19) Neel, J.V. et al. : Ann. Hum. Genet., **41** : 429, 1978.
- 20) Scozzari, R. et al. : Ann. Hum. Genet., **45** : 313, 1981.
- 21) Modiano, G. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci., **76** : 852, 1979.